第4卷第3期　　动 物 学 研 究　　Vol.4, №3
1983年8月　　ZOOLOGICAL RESEARCH　　Aug., 1983

浙江产眼镜蛇毒胆碱酯酶的研究
III、酶的疏水层析行为

佘微明　邱雪贞　屈贤铭
(中国科学院上海生物化学研究所)

陈　峰
(上海市劳动卫生职业病研究所)

摘　要

本文报导了三种疏水层析吸附剂的制备，并比较了这几种吸附剂对浙江产眼镜蛇毒胆碱酯酶的吸附情况，它们都能吸附这种酶、烷基越长吸附得越牢。经此疏水层析后的酶，在聚丙烯酰胺凝胶电泳中依旧有6条同工酶带、提示这些同工酶的疏水性质相似。

许多酶蛋白表面分布着构型不同的疏水性基团，可与其他含疏水性基团的物质吸附，后者固定化后，制成吸附剂进行柱层析，这就是所谓"疏水层析"。近年来随着亲和层析的广泛应用，疏水层析的技术也有了发展，目前不仅成为一种生物高分子分离纯化的方法，而且也为酶的疏水区性质的研究提供了线索。

最早用疏水层析法纯化酶取得成功的是糖元磷酸化酶，（Er-el efal, 1972）Massoulie等（1976）报导电鱼电组织中胆碱酯酶表面的疏水区被固定化吸附剂上的碳氢链吸附。我们（佘微明等，1981）在用亲和层析法纯化浙江眼镜蛇蛇毒胆碱酯酶的过程中观察到，所用亲和吸附剂"手臂"碳氢链的长短对分离纯化的效果有十分显著的作用，碳氢链越长对酶的吸附作用也强，看来这是由于酶表面的疏水性基团与碳氢链之间的亲和力。本文拟就酶的疏水行为作进一步报导。

材 料 及 方 法

1.浙江产眼镜蛇蛇毒的来源及胆碱酯酶活性测定方法、蛋白浓度测定法、酶的活力单位表示法、聚丙烯酰胺凝胶电泳法均同以前报导。（佘微明等，1981）

本文1982年8月26日收到，1983年1月19日收到修改稿。

己胺和辛胺均为 Koch-Light 出品。其余非常用试剂都是东风生化试剂厂提供。

2.疏水层析的吸附剂及其制备方法：所用疏水层析吸附剂有以下三种见表1。

表1 疏水层析吸附剂

编号	结构
吸附剂 Ⅰ	⌇—$NH(CH_2)_6NH$—CO—⬡
Ⅱ	⌇—$NH(CH_2)_5CH_3$
Ⅲ	⌇—$NH(CH_2)_7CH_3$

⌇— 代表琼脂糖凝胶

吸附剂的制备依据 Cuatrecasas 等人（1970）的方法，以琼脂糖凝胶4B 作为载体，溴化氰活化后分别连接已二胺、已胺及辛胺，后二者就是吸附剂Ⅱ及Ⅲ，连接已二胺者再通过缩合剂环己基-（3,3-二甲丙胺）羰二亚胺碘甲烷与苯甲酸连接，这就是吸附剂Ⅰ。

3.疏水层析法：同前文报导亲和层析法。（佘微明等，1981）将已制备好的吸附剂装入玻璃柱中，用磷酸缓冲液0.05*M*，pH7.8平衡。蛇毒干粉悬浮在同样的磷酸缓冲液中，浓度1％，3000转/分离心30分钟，除去少量不溶物，上清液上柱。

结 果

1.眼镜蛇毒胆碱酯酶在吸附剂Ⅰ上的层析行为：吸附剂Ⅰ在特定的层析系统中能完全吸附蛇毒胆碱酯酶，但0.01*M*的间-羟基苯基氯化铵不能将酶洗脱。有资料报导可加高盐溶液洗脱（Shaltial，1973，1974），我们加高盐浓度至0.1*M*的氯化钠能部分洗脱酶，0.2*M*的氯化钠可完全将酶洗脱但峰形平坦，改用0.2*M*的四乙基碘化铵则可以得到一个陡峰见图1，同时可取得较好的纯化效果，见表2。

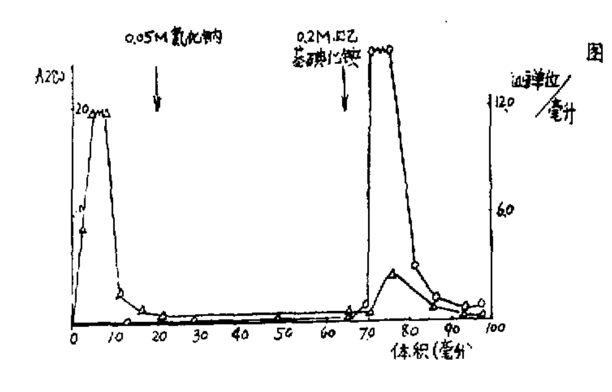


图1 酶在吸附剂Ⅰ上的层析行为，玻璃柱长12厘米，直径0.65厘米，柱体积4毫升，流速约20毫升/小时。蛇毒用磷酸缓冲液配制，离心后取4.5毫升上柱，然后分管收集，测定酶活力(-o—o-)和280毫微米的光密度(-△-△-)，箭头表示洗脱液加入处。

表 2　　吸附剂 I 对蛇毒胆碱酯酶的纯化

	总蛋白（毫克）	总活力（单位）	比活力	纯化倍数	活力回收(%)
原　蛇　毒	54	235	4.4		
层析柱上洗脱液*	0.68	118	174	40	51

* 系用0.1M四乙基碘化铵洗脱，其余处理均同图 1 说明。

用此法分离纯化的酶经超滤浓缩之后用聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，考马氏兰显色有杂蛋白，酶显色在相邻区域有 6 条明晰的区带，与原蛇毒相同，见图 2，提示了蛇毒中的胆碱酯酶的疏水性质相似。

2.眼镜蛇毒胆碱酯酶在吸附剂Ⅱ上的层析行为：此种吸附剂也能完全吸附蛇毒胆碱酯酶，0.1M氯化钠完全不能洗下，0.2M的四乙基碘化铵不能完全洗下，须用0.25M才能洗脱，见图 3。

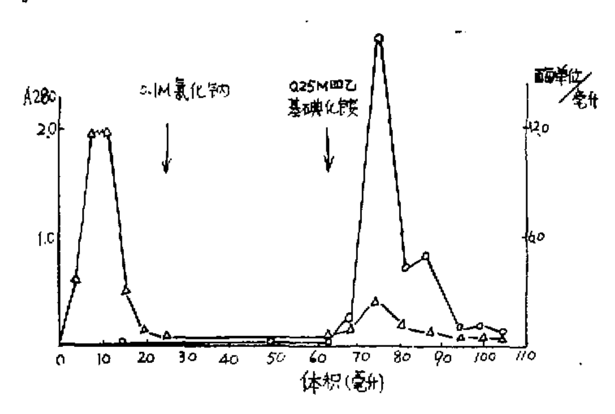


图 3　酶在吸附剂Ⅱ上的层析行为。说明见图 1

3.眼镜蛇毒胆碱酯酶在吸附剂Ⅲ上的层析行为：此种吸附剂同样能完全吸附蛇毒胆碱酯酶，0.1M氯化钠不能洗下，0.25M四乙基碘化铵洗脱时拖得很长。

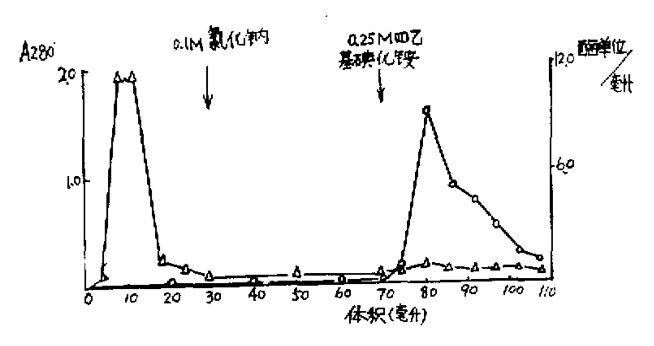


图 4　酶在吸附剂Ⅲ上的层析行为。说明见图 1

讨　论

1.吸附剂Ⅰ与前文报导（余微明等，1981）所用亲和层析吸附剂的差别仅在于前者的末端是一个苯环，而后者相同位置的苯环上还有一个间位季铵盐基团，这两者都能亲和吸附蛇毒中的胆碱酯酶，但是吸附剂上有一个季铵盐基团的可用低浓度的另一个季铵盐即间-羟基苯基三甲基氯化铵将酶洗脱，而吸附剂上有一个苯环的必须用较高的盐浓度才将酶洗脱，这种差别可能表示吸附剂作用于酶表面的区域有所不同，前者的季铵盐基团可与酶活性中心的阴离子部分通过静电引力的作用相吸引，可用另一种与酶结合K_I值更低的季铵盐将其洗脱，而后一种吸附剂上的苯环可与酶的疏水区通过非极性基团之间的疏水引力作用，因而必须用较高的盐浓度才能够洗下。用0.2M的四乙基碘化铵从疏水吸附剂上洗脱酶比同浓度的氯化钠好，这可能是由于四乙基碘化铵中有一个较大的极性基团。从酶纯化的角度看，在吸附剂上有一个可与酶的活性中心相作用的基团，对酶的作用更专一，可达到更好的纯化效果。

2.吸附剂Ⅱ、Ⅲ各有一个较长的烷基链，酶被吸附之后洗脱的条件随烷基链不同而有所差别，烷基链越长越难洗脱，表示它与酶的疏水区的吸力更大，而末端是苯环的吸附剂Ⅰ洗脱较易，这可能是由于酶的疏水区域的构型更接近于烷基链的构型状态，也可能烷基链像一个长臂更容易深入接触到酶的疏水区。

3.蛇毒胆碱酯酶有6个同功酶条带已在前文报导（余微明等，1981）在疏水层析过程中并不能将它们分开，这表示它们之间在疏水区的构型方面并无明显差别。

参考文献

余微明等 1981 浙江产眼镜蛇毒胆碱酯酶的研究（Ⅰ）酶的纯化，生物化学与生物物理学报 第13卷 第（1）期：45—54页。

Cuatrecasas, p 1970 protein purification by Affinity Chromatography. *J. Biol Chem.*, 245, 3059

Er-el, Z. et al. 1972 Hydrocarbon-coated Sepharoses. Use in the purification of Glycogen Phosphorylase. *Biochem. Biophys Res. Commun.*, 49, 383

Massoulie'. J. and Bon, S. 1976 Affinity Chromatography Acetylcholinesterase. *Eur. J. Biochem.*, 68, 531

Shmuel Shaltiel and EVI Er-el 1973 Hydrophobic Chromatography: Use for purification of Glycogen Synthetase. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 70 778

Shmuel Shaltiel Hydrophobic Chromatography. Methods in Enzymology Vol 34, part B, p126 1974 Ed, By Willian. B. Jokoly and Meir wilchek.

STUDIES ON THE CHOLINESTERASE FROM THE VENOM OF NAJA NAJA ATRA OF ZHEJIANG PROVINCE Ⅱ. SOME HYDROPHOBIC CHROMATOGRAPHIC BEHAVIOUR

She Weiming Qiu Xuezhen Qu Xianming
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica)

Cheng Feng
(Shanghai Institute of Occupational Disease and Industry Health)

This paper reported the preparation of three hydrophobic chromatographic absorbents and the comparison of some hydrophobic chromatographic behaviour of the cholinesterase from the Venom of Naja Naja atra. The length of the "Spacer arm" affected the adsorption of the enzyme, the more extended the carbon chain of the "Spacer arm", the stronger the adsorption of the enzyme. The cholinesterase from hydrophobic chromatography gave six bands in disc gel electrophoresis too. That implied a similar of the hydrophobic region of the isoenzymes.